

University of Groningen

## Characterization of 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes and their functional role in *Lactobacillus reuteri*

Bai, Yuxiang

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Bai, Y. (2016). *Characterization of 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes and their functional role in *Lactobacillus reuteri**. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# **Samenvatting en discussie**

Zetmeel is een van de belangrijkste koolhydraten op aarde en een belangrijke component van het humane dieet. Voor de talloze toepassingen van zetmeel in voedsel, papier- en textielindustrie en farmacie worden zetmeelderivaten geproduceerd via fysische, chemische en enzymatische behandelingen. Enzymatische omzetting van zetmeel kent verschillende voordelen zoals een laag energieverbruik, lage kosten, hoge bestuurbaarheid en hoge productiviteit. Daarom worden steeds meer enzymen die op zetmeel werken, zoals hydrolases en transglycosidases, geïntroduceerd in de levensmiddelen- en farmaceutische industrie voor de productie van ingrediënten zoals glucose- en fructosestroop, cyclodextrines en thermoreversibele gelen, en voor de structuurverbetering van deeg en brood, etc.

4,6- $\alpha$ -Glucanotransferases (4,6- $\alpha$ -GTases) zijn recent ontdekte enzymen die een  $\alpha 1 \rightarrow 4$  binding van het niet-reducerende uiteinde van zetmeel of maltodextrines hydrolyseren en het afgesplitste (glucose)molecuul overbrengen naar het niet-reducerende uiteinde van een acceptor substraat. Meestal wordt hierbij een  $\alpha 1 \rightarrow 6$  glycosidische binding gevormd, en af en toe een  $\alpha 1 \rightarrow 4$  glycosidische binding. Op deze wijze worden isomalto-/malto- oligosacchariden (IMMO) en polysacchariden (IMMP) gevormd. In tegenstelling tot andere zetmeel hydrolyserende enzymen, die meestal behoren tot de glycoside hydrolase familie (GH) 13, 57, of 77, zijn 4,6- $\alpha$ -GTases ingedeeld in een onderfamilie van GH70; GH70 bestaat voornamelijk uit glucansucrases (GS). De GS enzymen, dextransucrase, mutansucrase, reuteransucrase en alternansucrase, gebruiken sucrose voor de productie van  $\alpha$ -glucanen met verschillende soorten bindingstypen zoals  $\alpha 1 \rightarrow 2$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 3$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 4$  en  $\alpha 1 \rightarrow 6$  glycosidische bindingen. Net als GS worden 4,6- $\alpha$ -GTases uitsluitend gevonden in melkzuurbacteriën (Lactic Acid Bacteria, LAB). In tegenstelling tot GS zijn 4,6- $\alpha$ -GTases inactief op sucrose, maar actief op zetmeel. Beide typen enzymen bezitten een circulair gepermuteerde  $(\alpha/\beta)_8$ -cilinder als katalytische kern en ze hebben dezelfde domein opbouw, die bestaat uit een variabel N-terminaal gedeelte, domeinen A, B, C, en extra domeinen IV en V (**Hoofdstuk 1**).

### **Productie en karakterisatie van 4,6- $\alpha$ -GTases**

De IMMP geproduceerd door 4,6- $\alpha$ -GTases kunnen op termijn mogelijk worden toegepast in voedingsmiddelen, zoals oplosbare voedingsvezels met een

prebiotische werking. Zetmeel dat enzymatisch is gemodificeerd met deze enzymen kan ook speciale rheologische eigenschappen hebben die interessant zijn voor toepassing in de voedingsmiddelen industrie. Echter, de industriële toepassing van 4,6- $\alpha$ -GTases vormt voorlopig nog een uitdaging.

GtfB van *Lactobacillus reuteri* 121 is het eerst beschreven 4,6- $\alpha$ -GTase. De productie van IMMP door GtfB is goed onderzocht. Wanneer het GtfB enzym tot expressie wordt gebracht in *Escherichia coli* is de opbrengst laag, en onvoldoende voor toepassingen op industriële schaal. Echter, een grote hoeveelheid GtfB eiwit hoopt zich in onoplosbare vorm op in zogenaamde inclusionbodies (**Hoofdstuk 2**) in de cellen van *E. coli*. De traditionele manier om hieruit actief enzym te halen, via het denatureren en hervouwen van het eiwit, resulteerde in een aanzienlijk herstel van de enzymatische activiteit. Daarnaast vertoonden de inclusionbodies zelf ook enige enzymatische activiteit. Dit soort inclusionbodies, waarvan de activiteit gedeeltelijk behouden blijft, worden beschouwd als 'niet-klassieke inclusion bodies' (ncIBs). De verschillende GtfB enzymen (oplosbaar, hervouwen en ncIB) produceren allemaal IMMP met vergelijkbare grootte. Daarnaast hebben de ncIB enzymen een hogere thermostabiliteit. GtfB geproduceerd via hervouwing of in de vorm van ncIB kan daarmee een bijdrage leveren aan de productie van IMMP en gemodificeerd zetmeel op industriële schaal.

Van glucansucrases is bekend dat deletie van het N-terminale en/of C-terminale domein de heterologe expressie aanzienlijk kan verbeteren. GtfB, homoloog aan glucansucrases, verschilt onder meer van GS vanwege het ontbreken van het C-terminale deel van domein V. Deletie van het N-terminale gebied van GtfB (aminozuren 1-733) resulteerde in een verhoogde opbrengst van oplosbaar GtfB- $\Delta$ N enzym (75 voudige toename) zonder dat daardoor de activiteit van het enzym en de gevormde producten werden beïnvloed (**Hoofdstuk 3**).

De ontwikkeling van geschikte assays voor bepaling van de activiteiten van 4,6- $\alpha$ -GTases is essentieel voor zowel hun gedetailleerde biochemische karakterisering als voor de ontwikkeling van industriële toepassingen. Bestaande assays kunnen geen onderscheid maken tussen de specifieke hydrolyse en transglycosylerings activiteit van zulke enzymen, waardoor het niet mogelijk is om een kinetische analyse te doen. Daarom hebben we een nieuwe methode

ontwikkeld die is gebaseerd op de traditionele amylose jodium kleuringsassay (**Hoofdstuk 3**). Met deze assay kan zowel de hydrolyse als de totale activiteit nauwkeurig bepaald worden, waarna de transglycosylerings activiteit kan worden berekend. Hiermee hebben we de 4,6- $\alpha$ -GTases biochemisch gekarakteriseerd, waaronder bepaling van hydrolyse (H) en transglycosylerings (T) activiteit, substraatspecificiteit en acceptor efficiëntie. De verhouding T/H voor GtfB- $\Delta$ N is met behulp van deze assay vastgesteld op 4,3:1.

### **Kristalstructuur van GtfB**

Om beter inzicht te krijgen in het katalytische mechanisme van 4,6- $\alpha$ -GTases hebben we de kristalstructuur bepaald van een (volledig actief) fragment van GtfB (GtfB- $\Delta$ N $\Delta$ V) uit *L. reuteri* 121 (**Hoofdstuk 6**). Zoals voorspeld lijkt de structuur van GtfB- $\Delta$ N $\Delta$ V sterk op die van glucansucrases, met een vergelijkbare domeinstructuur. In tegenstelling tot GS bevat het katalytisch centrum een verrassend lange groef met daarin meerdere donor substraat bindingsplaatsen. De aanwezigheid van deze tunnel, die gevormd wordt door drie eiwitlussen die uniek zijn in 4,6- $\alpha$ -GTases, verklaart dat GtfB alleen de lineaire ketens van zetmeel als donorsubstraat kan gebruiken, en verklaart ook de voorkeur van het enzym voor substraten met een hoog amylose gehalte. Door inzicht in de enzymstructuur te combineren met kennis over de acceptor specificiteit, kunnen we nu het productspectrum van 4,6- $\alpha$ -GTase verklaren met een nieuw mechanisme, waarbij het enzym één of meerdere glucosyl eenheden tegelijk naar een acceptor substraat kan overbrengen. Daarnaast ondersteunt de kristalstructuur van GtfB- $\Delta$ N $\Delta$ V het idee dat de 4,6- $\alpha$ -GTase subfamilie een evolutionair intermediair vormt tussen  $\alpha$ -amylase en glucansucrase enzymen.

### **Biologische rol van 4,6- $\alpha$ -GTases in *Lactobacillus reuteri***

Glucansucrases komen voor in melkzuurbacteriën en staan erom bekend bij te dragen aan de vorming van exopolysaccharides (EPS), die een rol spelen bij de vorming van biofilms. Bacteriële biofilms zorgen voor hechting van bacteriën aan bijvoorbeeld het tandoppervlak wat uiteindelijk kan leiden tot cariës. Voor de bacteriën heeft EPS ook nog andere functies zoals waterretentie, gebruik als reserve voedingsbron, bescherming tegen externe factoren, opname van organische verbindingen, immobilisatie van enzymen, enzovoort. 4,6- $\alpha$ -GTase vormt *in vitro* een polysaccharide uit maltodextrinen of zetmeel, daarom werd in

hoofdstuk 4 onderzocht of 4,6- $\alpha$ -GTase ook *in vivo* bijdraagt aan de vorming van EPS in melkzuurbacteriën (**Hoofdstuk 4**). In de modelstam *L. reuteri* 121 is vastgesteld dat het gen dat codeert voor GtfB van essentieel belang is voor de vorming van EPS bij groei op maltodextrines of zetmeel als koolstofbron. *L. reuteri* 121 kan in deze condities amylose en amylopectine omzetten waarbij nieuwe met name  $\alpha 1 \rightarrow 6$  glycosidische bindingen worden gevormd. Het *in vivo* gevormde EPS bestaat uit dezelfde fragmenten als IMMP dat *in vitro* wordt geproduceerd door GtfB. Het gevormde EPS kan worden gebruikt als koolstof- en energiebron voor de groei van sommige prebiotische bifidobacteriën; het EPS is dus een potentieel prebioticum. De *L. reuteri* stammen die deze voedingsvezels en potentiële prebiotica kunnen produceren bieden interessante mogelijkheden voor toepassingen in de productie van gefermenteerde levensmiddelen.

Bacteriën behorende tot de geslachten *Lactobacillus* en *Streptococcus* komen voor in de mondholte, waar ze EPS produceren uit sucrose met hun glucansucrase enzymen. Sucrose en zetmeel zijn belangrijke koolhydraten in het moderne humane dieet. Van sucrose is bekend dat het cariogeen is, terwijl de rol van zetmeel hierin nog ter discussie staat. Wel is vastgesteld dat een combinatie van zetmeel en sucrose de vorming van biofilms beïnvloedt en daarmee een effect heeft op cariës. Het mechanisme hiervan is niet duidelijk. De ontdekking van de aanwezigheid van glucansucrase GtfA én 4,6- $\alpha$ -GTase GtfB in *L. reuteri* stammen kan leiden tot nieuwe inzichten ten aanzien van de vorming van biofilms en cariogeniciteit. Zowel *in vivo* als *in vitro* resultaten laten een synergistische werking zien van GtfB en GtfA in de aanwezigheid van zowel zetmeel als sucrose (**Hoofdstuk 5**). Daarmee is een nieuwe route aangetoond voor de vorming van EPS door melkzuurbacteriën uit verschillende koolhydraten; bestudering hiervan kan bijdragen aan het onderzoek naar tandcariës.

### Kansen en uitdagingen

4,6- $\alpha$ -GTases produceren oplosbare voedingsvezels en potentiële prebiotica uit zetmeel of maltodextrinen, die mogelijk toepasbaar zijn in de voedingsindustrie. Andere mogelijke toepassingen van IMMP zijn het stabiliseren van eiwitten tijdens vriesdrogen, verbeteren van de oplosbaarheid van eiwitten en

geneesmiddelen, vervangen van vet in voedingsmiddelen en vervanging van zetmeel met een caloriearme vulstof. Het is mogelijk dat 4,6- $\alpha$ -GTase-gemodificeerd zetmeel speciale rheologische eigenschappen heeft die specifieke toepassingen mogelijk maakt. De driedimensionale structuur van GtfB- $\Delta$ N $\Delta$ V is van belang voor de verdere engineering van dit eiwit, bijvoorbeeld voor de aanpassing van de substraatspecificiteit of synthetiseren van producten met verschillende percentages glycosidische bindingen. De ontdekking van *Lactobacillus* stammen met een gen coderend voor 4,6- $\alpha$ -GTase opent nieuwe perspectieven voor de toepassing van deze bacteriën in levensmiddelen.

Er bestaan echter ook nog veel onzekerheden rond de industriële toepassing van 4,6- $\alpha$ -GTases. Ten eerste, het is onduidelijk hoe 4,6- $\alpha$ -GTase precies de modificatiereactie op zetmeel uitvoert. Eén van de mogelijkheden is dat de  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 gelinkte amylopectin zijketens worden omgezet in  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6 gelinkte ketens, welke zich nog steeds aan de buitenkant van de amylopectin moleculen bevinden. De andere mogelijkheid is dat de  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 gelinkte zijketens van amylopectin worden gekloofd zodat losse  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6 gelinkte ketens worden gevormd. Ten tweede, het mechanisme en lokatie van de afbraak van IMMP in de spijsvertering van de mens moet nog nader worden onderzocht. Ten derde, de thermostabiliteit en de activiteit van 4,6- $\alpha$ -GTase moeten aanzienlijk worden verbeterd voordat gebruik op industriële schaal mogelijk wordt. Hiervoor, heeft een computerontwerp de voorkeur. Voor directe toepassing van *Lactobacillus* stammen met 4,6- $\alpha$ -GTase is het noodzakelijk dat ook het expressieniveau en de activiteit onder fermentatiecondities worden verbeterd. Deze relatief grote uitdagingen vormen tegelijkertijd ook de charme van het onderzoek aan 4,6- $\alpha$ -GTases.